

学校编码: 10384

学号: 19220051301756

分类号__密级

UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

SAS-A 技术制备胰岛素微纳米颗粒及其复合微粒

Insulin Nano- and Micro-particles and Its

Composites Prepared by SAS-A

蒋茂星

指导教师姓名: 李军 教授

专 业 名 称: 化 学 工 程

论文提交日期: 2008 年 6 月

论文答辩时间:

学位授予日期:

答辩委员会主席: __

评阅人: __

2008 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。
本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其他指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密 (), 在年解密后适用本授权书。

2. 不保密 ()

作者签名: 日期: 年 月 日

导师签名: 日期: 年 月 日

摘 要

超临界流体(SCF)技术已经在许多领域获得了重要的进展。利用 SCF 的高膨胀能力、对有机溶剂的萃取能力, SCF 技术可应用于对各种物质进行微粒化及其微囊化(或复合微粒化); 利用其性质对温度和压力的敏感性, 可以调节这些操作条件来控制所得微粒的形貌、粒径大小和分布; 另外, SCF 技术尤其对热敏感、结构不稳定和具有生物活性的物系的微粒化或微囊化具有明显优势。课题组和国外合作提出了超临界流体抗溶剂-雾化 SAS-A (supercritical anti-solvent atomization) 技术, 该技术以 SEDS (solution enhanced dispersion by supercritical fluids) 和 PGSS (particle formation from gas-saturated solution) 为基础, 能处理含水体系。

首先计算了实验体系所涉及的二元和三元系统高压下液相体积膨胀率。用 t-mPR 状态方程(EoS)对 CO_2 +丙酮、 CO_2 +乙醇二元体系和 CO_2 +乙醇+水三元体系的高压汽液平衡(VLE)进行计算, 并与课题组之前采用 PR-EoS 得到的结果进行比较。结果表明 t-mPR EoS 可以对这些体系的 VLE 取得较好的计算效果。进一步对上述体系的液相体积膨胀率进行预测, t-mPR EoS 对二元体系预测结果比 PR-EoS 的预测结果的精度有所提高, 对三元体系的预测表明其在 7.8MPa 左右能更好地反映实验现象。另外, 计算还表明: CO_2 +丙酮体系的体积膨胀率要远远大于 CO_2 +乙醇体系; 对 CO_2 +乙醇+水三元体系的体积膨胀率在 7.8MPa 左右有一个最大值, 提高乙醇在乙醇/水溶液中的摩尔分数, 可以提高该溶液的最大体积膨胀率。

以 SAS-A 技术研究从乙醇、丙酮及乙醇/水中制备聚乙二醇(PEG)微粒。探讨预膨胀压力、溶液浓度和溶液流量等工艺参数对所制备的 PEG 微粒形态及粒径的影响; 重点讨论不同溶剂对颗粒形态和粒径分布的影响。结果表明, 制备得到的 PEG 微粒基本上为球形, 利用丙酮和乙醇, 粒径分布分别可以控制在 1-5 μm 和 2-15 μm 之间; 增大预膨胀压力容易得到分散的球形微粒, 并能减小其粒径, 粒径分布也随之变窄; 对应 PEG/丙酮体系, 溶液浓度升高, 所得到的微粒粒径增大; 对应 PEG/乙醇体系, 溶液浓度对粒径大小影响不大, 但溶液浓度增大会使粒径分布变宽; 采用乙醇水溶液为溶剂时, 初始乙醇浓度越低, 移出水的效果越差, 易形成结块的不规则微粒。

以 SAS-A 技术研究从胰岛素/乙醇/水溶液中制备胰岛素微粒。探讨各种操作参数对微粒形态、平均粒径和胰岛素活性的影响。在各种操作条件下制备的胰岛素产品均为球形微粒, 粒径分布主要在 0.1-1.5 μm 之间。操作压力在 8MPa 左右有良好的水

移除能力,进一步增大压力会使所得微粒倾向于团聚。通过改变操作条件可以有效地控制微粒的形态和大小:降低溶液流量会使微粒变小,粒径分布变窄,但是流量低于 2ml/min 时,倾向于生成不规则颗粒;在所选的胰岛素浓度范围内,增大浓度可以使微粒粒径变小,粒径分布也随之变窄;乙醇浓度对微粒形态和大小影响不大,但是对胰岛素活性的起主要影响作用,乙醇浓度越高,胰岛素活性损失越大;其它操作条件的改变对胰岛素活性的影响不明显,活性均保持在 90%以上。FTIR 与 DTA 的测试结果表明,胰岛素活性丧失与其二级结构的变化有关,即 β -折叠的增强和 α 螺旋的减小。

以 SAS-A 技术研究制备 PEG/胰岛素复合微粒;改进的 SAS-A 技术流程研究制备三棕榈酸甘油酯/胰岛素复合微粒。探讨工艺参数和操作条件对微粒形貌、粒径大小、分布的影响。进行复合微粒的胰岛素的溶出(控释)实验,研究复合微粒中蛋白质和载体的结合情况、控释情况。研究表明,不同条件下所得 PEG/胰岛素复合微粒为近球形,该复合微粒的控释实验说明其中 PEG 和胰岛素的结合良好。研究表明,不同温度条件下得到的三棕榈酸甘油酯/胰岛素复合微粒形态不同:45°C 时得到块状附着有小球颗粒,50°C 时得到较为特殊的菊花状颗粒;该复合微粒的控释实验表明:45°C 时得到的复合微粒仍然存在突释,前一分分钟的胰岛素释放量达到了 36%,50°C 时得到的复合微粒有很好的控释效果,完全没有突释现象。

关键词:超临界流体;微粒化;聚乙二醇;胰岛素;三棕榈酸甘油酯;复合微粒

Abstract

Supercritical fluid (SCF) technology has been widely applied to various areas, and very important progress has been achieved. Among the applications, particle formation or encapsulation with assistance of SCF by using its high solvency power and expansion ability to lots of solvents is a hot research topic in recent decades. It is possible to control the morphology, particle size (PS), and particle size distribution (PSD) for the produced products due to the sensitivity of SCF to the operating temperature and pressure. Furthermore, it is also available for the formulation of those materials such as active substances, thermosensitive substances, which usually cannot be processed by conventional methods. In this thesis, supercritical anti-solvent atomization (SAS-A), which is a combination of SEDS (solution enhanced dispersion by supercritical fluids) and PGSS (particle formation from gas-saturated solution), was employed to study the precipitation of polyethylene glycol 6000 (PEG) and insulin microparticles, as well as PEG/insulin and tripalmitin/insulin composite microparticles.

Prior to the particle formation study, the volume expansion of the liquid phases for the CO₂/acetone and CO₂/ethanol binary systems and the CO₂/ethanol/water ternary system was investigated using the t-mPR equations of state (t-mPR EoS) and the PR equations of state (PR-EoS). The correlations for the published vapor-liquid equilibrium (VLE) data of the above systems show that both the EoS can provide fairly good VLE calculations for the binary systems, but t-mPR EoS gives slightly better results. The volume expansion prediction for the above systems and the comparison with the published data show that, compared to PR-EoS, t-mPR EoS gives better results for the binary systems but worse results for the ternary system, but provides more reasonable results around 7.8MPa. Moreover, the calculations indicate that the volume expansion of the CO₂/acetone system is always larger than that of the CO₂/ethanol system. The volume expansion of the ternary system shows a maximum point corresponding to about the CO₂/ethanol mixture's critical pressure (about 7.8MPa); increase in the content of ethanol can improve the maximum volume expansion and therefore help to enhance the removal of water.

The SAS-A process was applied to the generation of PEG microparticles from different solvents (acetone, ethanol, and ethanol/water). The effect of the processing conditions, including operating pressure, PEG concentration, and solution flow rate, on the morphology and size of the produced PEG particles was investigated, especially, the

influence of using different solvents was evaluated. The PEG particles produced by using acetone and ethanol are generally spherical with sizes of 1-5 μ m and 2-15 μ m, respectively. A high pre-expansion pressure can produce spherical and discrete particles with relatively small size and narrow size distribution. Increasing the PEG concentration in acetone can evidently increase the PEG particle sizes and widen the PSD for the PEG/acetone system, while increasing the PEG concentration can slightly widen the PSD, but has little effect on the PEG particle sizes for the PEG/ethanol system in the studied concentration range. Decreasing the content of ethanol in the ethanol/water solution can generate irregular and agglomerated particles due to the difficulty of water removal.

The SAS-A process was employed to produce insulin particles from its ethanol/water solutions at 45°C. The effect of the operating conditions on the morphology, size and bioactivity of the produced insulin particles was evaluated. The formed primary particles are spherical and discrete with sizes of 0.1-1.5 μ m. The loss of the activity of the insulin particles depends on the ethanol content in the solution; other operating conditions show little effect on the insulin particles' activity. It is possible to produce insulin microparticles with almost no loss of its bioactivity by the SAS-A process at low ethanol content (less than 40% in mass). The FTIR and DTA analyses compared to that of the unprocessed insulin confirm that the changes in the content of α -helix and β -sheet decrease the protein activity.

Finally, the SAS-A process was employed to produce PEG/insulin composite microparticles, and a modified SAS-A process was employed to produce tripalmitin/insulin composite microparticles. The effects of different carrier materials, different ratios of carrier/insulin on the particle morphology and PSD and the insulin release from the produced composites were examined. Good combination of insulin to PEG in spherical composites is indicated on the basis of the insulin release from the PEG/insulin composite. Initial burst completely disappears for the insulin release from the tripalmitin/insulin composite particles (particles like flowers) produced at 50°C by the modified SAS-A process, while the initial burst is still high (36% in 1 min) for the tripalmitin/insulin composite particles (large particles attached with spheres) obtained at 45°C.

Keywords: supercritical fluids; micronization; PEG; insulin; tripalmitin; composite particles

目 录

第一章 文献综述.....	1
1.1 超临界流体简介.....	1
1.1.1 SCF 性质.....	1
1.1.2 SCF 技术应用.....	3
1.2 SCF 微粒化技术.....	3
1.2.1 RESS 技术.....	4
1.2.2 PGSS 技术.....	4
1.3 SAS 技术.....	5
1.3.1 GAS 技术机理和研究进展.....	5
1.3.2 ASES 技术和 SEDS 技术的机理.....	7
1.3.3 ASES 技术研究进展.....	8
1.3.4 SEDS 技术研究进展.....	9
1.3.5 SAS-A 技术简介.....	10
1.4 本论文立意和研究内容.....	11
第二章 高压二元和三元体系的体积膨胀计算.....	13
2.1 引言.....	13
2.2 相关体系相平衡及体积膨胀研究简述.....	13
2.3 t-mPR 状态方程.....	16
2.4 计算方法.....	18
2.4.1 相平衡计算方法.....	18
2.4.2 体积膨胀率计算.....	18
2.5 计算结果.....	20
2.5.1 相平衡计算结果.....	20
2.5.2 体积膨胀率计算结果.....	22
2.6 小结.....	24
第三章 载体材料 PEG 的微粒化.....	26

3.1 引言	26
3.2 实验部分	27
3.2.1 实验试剂	27
3.2.2 实验装置及流程	27
3.2.3 分析方法	28
3.3 实验结果与讨论	28
3.3.1 乙醇/PEG 和丙酮/PEG 系统	28
3.3.2 PEG/乙醇/水系统	34
3.3.3 溶剂残留	36
3.4 小结	36
第四章 SAS-A 技术制备胰岛素微粒	38
4.1 引言	38
4.2 胰岛素简介	38
4.2.1 结构	39
4.2.2 物理化学性质	41
4.2.3 应用	42
4.3 SCF 微粒化技术制备胰岛素微粒	42
4.4 实验部分	44
4.4.1. 实验试剂和材料	44
4.4.2 实验装置及流程	44
4.4.3 分析方法	44
4.5 实验结果与讨论	47
4.5.1 蛋白浓度对微粒的影响	48
4.5.2 溶液流量对微粒的影响	49
4.5.3 乙醇浓度对微粒的影响	51
4.5.4 产品胰岛素生物活性研究	53
4.6 小结	56
第五章 胰岛素/PEG 和胰岛素/三棕榈酸甘油酯复合微粒	57

5.1 引言	57
5.2 三棕榈酸甘油酯简介	59
5.3 实验部分	61
5.3.1 实验试剂和材料	61
5.3.2 实验装置及流程	61
5.3.3 分析方法	62
5.4 实验结果与讨论	63
5.4.1 胰岛素/PEG 复合微粒	63
5.4.2 胰岛素/三棕榈酸甘油酯复合微粒	66
5.5 小结	71
第六章 结论与建议	72
参考文献	74
致 谢	86

Contents

CHAPTER 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Supercritical Fluids	1
1.2 Preparation of Microparticles by Supercritical Fluids	3
1.3 Supercritical Anti-Solvent Process.....	5
1.4 Research Objective and Contents.....	11
CHAPTER 2 VOLUME EXPANSION OF THE RELATED SYSTEMS.....	13
2.1 Introduction	13
2.2 VLE and Volume Expansion of the Related Systems	13
2.3 t-mPR Equation of State.....	16
2.4 Calculation method	18
2.5 Results and discussion.....	20
2.6 Conclusion.....	24
CHAPTER 3 MICROPARTICULATION OF WALL MATERIAL PEG.....	26
3.1 Introduction	26
3.2 Experimental	27
3.3 Results and discussion.....	28
3.4 Conclusion.....	36
CHAPTER 4 MICROPARTICULATION OF INSULIN.....	38
4.1 Introduction	38
4.2 insulin	38
4.3 Microparticulation of insulin by SCF	42
4.4 Experimental	44
4.5 Results and discussion.....	46
4.6 Conclusion.....	56
CHAPTER 5 INSULIN/PEG AND INSULIN/TRIPALMITIN.....	57

5.1 Introduction	57
5.2 Tripalmitim.....	59
5.3 Experimental	61
5.4 Results and discussion.....	63
5.5 Conclusion.....	71
CHAPTER 6 CONCLUSIONS.	72
REFERENCES.	74
ACKNOWLEDGEMENT.	86

厦门大学博士论文摘要库

第一章 文献综述

本章概述超临界流体的特性和现有的超临界流体技术,介绍超临界流体微粒化技术的研究进展和应用,重点介绍超临界流体抗溶剂技术在制备超细微粒和处理蛋白质方面应用。提出本论文的研究内容。

1.1 超临界流体简介

从超临界现象被发现距今已接近两百年,但超临界流体 (supercritical fluid, SCF) 技术得到长足发展却是近几十年的事情,人们对超临界流体的性质和各方面的应用进行了大量研究,并不断取得新的进展,一些技术已经得到了广泛的应用^[1]。

1.1.1 SCF性质

图1-1是典型的纯流体的压力—温度图。物质的气相和液相处于平衡态时,随温度和压力升高(沿汽液平衡曲线),热膨胀使液体密度变小,而压力升高使气体的密度增加,当温度和压力达到一定值(临界点, Critical point)时,两相的密度变得相同,气—液的分界面消失,物质呈现为一种既非气体又非液体的状态,即超临界状态^[2]。与该点对应的温度和压力分别称为临界温度 T_c 和临界压力 P_c 。温度高于 T_c 且压力高于 P_c 的区域属于超临界流体区,处于该区域的流体称之为SCF。

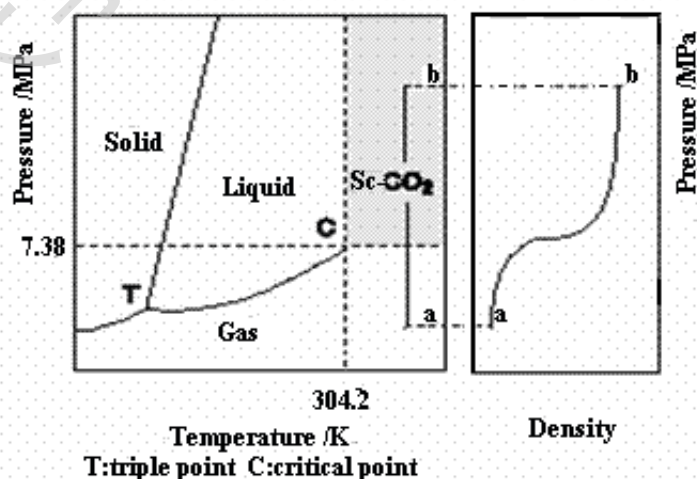


Figure 1-1. Phase diagram of CO₂ and its density as a function of pressure.^[3]

从图中还可以看出, SCF的密度在临界点附近随温度和压力变化特别敏感。

此外, SCF还具有其它许多特殊的性质如表1-1所示: SCF的密度, 溶解能力与液体相近, 而其粘性则与气体相近; SCF的扩散系数处于气体与液体之间, 比液体大近100倍; SCF中, 物质的移动以及浓度平衡状态的建立非常快, 可以促进高效分离过程的实现。

Table 1-1. Proprieties of gas, liquid and supercritical fluid^[4].

Fluid state	Density, g/cm ³	Viscosity, g/(cm·s)	Diffusion coefficient, cm ² /s
Gas	(0.6-2.0)×10 ⁻³	(1.0-3.0)×10 ⁻⁴	0.1-0.4
SCF	0.2-0.9	(1.0-9.0)×10 ⁻⁴	(2.0-7.0)×10 ⁻⁴
Liquid	0.6-1.6	(0.2-3.0)×10 ⁻²	(0.2-2.0)×10 ⁻⁵

常用的超临界物质有CO₂、甲烷、水等, 其中最常用的是CO₂。表1-2列出了一些常用SCF的临界温度、临界压力和临界密度, 从中我们可以看到CO₂临界温度 ($T_c=31.3^{\circ}\text{C}$)、临界压力 ($P_c=7.37\text{MPa}$) 较为适中, 而相对临界温度和临界压力同样较低的甲烷、乙烷、乙烯等它又具有化学性质稳定、不易燃等优点。另外CO₂还具有临界密度较高、溶解性能好、无污染、价格便宜、安全、无毒、无味、无色等优点。

Table 1-2. Critical constants of some substances^[5].

Substance	Formula	T_c , MPa	P_c , °C	ρ_c , g/cm ³
Carbon dioxide	CO ₂	7.39	31.06	0.448
Water	H ₂ O	22.00	374.2	0.344
Methanol	CH ₃ OH	7.99	240.5	0.272
Ethanol	C ₂ H ₅ OH	6.38	243.4	0.276
Methane	CH ₄	4.6	-83.0	0.16
Ethane	C ₂ H ₆	4.89	32.4	0.203
Propane	C ₃ H ₈	4.25	96.6	0.217
Aether	C ₄ H ₁₀ O	3.68	193.6	0.267
Ethene	C ₂ H ₄	3.14	9.5	0.200

P_c : critical pressure; T_c : critical temperature; ρ_c : critical density.

1.1.2 SCF技术应用

SCF方法作为一项新技术,在许多领域中获得了重要的进展。由于SCF要求的温度和压力条件比较温和,特别适用于提取或精制热敏性和易氧化的物质。此外,SCF容易除去,所制备产品无残留毒性,特别适用于食品和医药工业。近些年来,超临界分离技术(超临界萃取、超临界色谱、超临界沉析分离)、超临界化学反应(超临界的酶催化反应、超临界水处理)、超临界材料加工技术(超临界沉析造粒、超临界细胞破碎、超临界干燥、超临界溶胀、超临界灭菌)等方面的研究都有广泛应用。其中,超临界萃取技术在脱除咖啡因、提取植物油、提取啤酒花等方面已有生产规模应用;SCF微粒化技术也已经有工业化或者进入中试研究,如气体饱和溶液微粒形成技术制备聚合物微孔颗粒^[6]及美国菲柔公司(Ferro Corporation)的SCAMP过程^[7]。近些年来,使用SCF作为反应媒介的报导也很多,原因在于SCF可改变相行为、扩散速率和溶剂化效应,能使反应物均相化,使扩散系数增大,有利于扩散控制反应,控制相分离过程、产物的分布^[8]。如1994年美国Eco废物技术公司建成的世界上第一套超临界水氧化法工业装置,对有机物和胺的去除率为99.9999%^[9]。

1.2 SCF 微粒化技术

超细微粒,在当今的高新技术中已经成为一个热门领域,在材料、化工、轻工、冶金、电子、医学、生物医学以及环境科学等领域已经得到广泛应用^[10]。传统的微粒形成方法如物理粉碎法、溶液结晶、冷冻干燥法等往往有操作条件不温和、有机溶剂残留、产品微粒粒径较大、粒径分布较宽等缺点。而利用超临界流体特有的高膨胀能力、对有机溶剂的萃取能力以及CO₂的反萃取能力,可以制备出超细微粒,再结合温度压力等操作条件的调节,可以控制所得微粒的形貌和粒径分布。这种方法具有产品纯度高、几何形状均一、粒径分布窄、制造工艺简单、操作适中等许多优点,尤其对热敏感、结构不稳定和具有生物活性的物系的处理具有明显优势^[11]。

目前已经提出了多种SCF微粒化技术,其中研究比较深入,为人们所熟悉的大致有下面三种:

- (1) 超临界流体快速膨胀技术(Rapid Expansion of Supercritical Solutions, RESS);

- (2) 超临界流体抗溶剂技术 (Supercritical fluid Anti-Solvent, SAS);
- (3) 气体饱和和溶液微粒形成技术 (Particles from Gas-Saturated Solutions or Suspensions, PGSS)。

由于本文采用的是 SAS 技术, 本章将对 RESS 过程和 PGSS 过程的原理、流程及应用做一个简单介绍, 而对 SAS 过程作重点阐述。

1.2.1 RESS 技术

RESS 过程的要求为: 固体溶质在超临界溶剂中有一定的溶解度, 再利用 SCF 的溶剂化能力对温度和压力变化十分敏感这一特性, 进行微粒化。其基本过程为: 将溶质溶解于一定温度和压力的 SCF, 溶液通过一个特制的喷嘴进行膨胀, 在非常短的时间 ($<10^{-5}$ - 10^{-6} s) 内减压, 形成一个以音速传递的机械扰动。这种快速膨胀过程会使超临界溶液达到极高的过饱和度 (可达 10^5 - 10^8), 使溶质在瞬间形成大量的晶核, 并在很短的时间内完成晶核的生长, 从而生成大量微小的、粒度分布均匀的超细微粒^[12]。

RESS 操作容易, 过程简单, 是研究得较早的一项技术^[13], 由于该过程不使用有机溶剂而受到青睐。其快速推进的机械扰动使成核介质均一化, 制得的微粒粒度均一; 快速降压所产生的极高过饱和度使得微粒粒径很小。利用这种技术可在较温和的操作条件、较小的温降条件下得到较传统气流粉碎法小的、均一且无溶剂残留的微细颗粒, 并可以通过改变过程参数调节微粒粒度和形态。影响微粒形态和尺寸的主要因素有: 原料的性质 (如熔点、在 SCF 中的溶解度)、操作温度、操作压力、喷嘴的几何形状和尺寸等。Domingo^[14]、Reverchon^[15]、Mohamed^[16] 都详细讨论过这些操作因素对微粒大小和粒径分布的影响, 得出了一些指导性结论。

但在 RESS 过程中, 只有当固体溶质在超临界溶剂中有一定的溶解度, 在快速膨胀过程中能形成稳定的固-液平衡态时, 微粒化才能顺利进行, 这限制了 RESS 的应用。因为在 SCF (如 CO_2) 中有理想溶解度的物质是很少的。可以采用加入合适的助溶剂来提高溶质在 SCF 中的溶解度, 但同时又增加了过程的复杂性和成本。另外, 采用 RESS 过程, SCF 的消耗量比较大、成本较高^[4], 而推广到大规模生产时, 由于往往需要多个喷嘴或多孔盘, 过程不容易控制, 颗粒分布范围较单个喷嘴变宽^[17]。

1.2.2 PGSS 技术

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库